



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 37 607 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
C 12 N 15/10
C 12 Q 1/37
C 07 H 21/00
C 07 H 1/06

⑦① Aktenzeichen: 199 37 607.7
⑦② Anmeldetag: 9. 8. 1999
④③ Offenlegungstag: 15. 2. 2001

DE 199 37 607 A 1

⑦① Anmelder:
BILATEC Gesellschaft zur Entwicklung
biotechnologischer Systeme mbH, 07407
Rudolstadt, DE

⑦④ Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦② Erfinder:
Bergmann, Clemens, Dr., 07745 Jena, DE;
Bienhaus, Gerhard, Dr., 82407 Wielenbach, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:
US 56 58 548
US 51 87 083
WO 99 29 840 A1
WO 99 16 781 A2
WO 98 59 076 A1
WO 98 31 840 A1
WO 96 41 811 A1
WO 94 14 824 A2
WO 88 06 633 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Reagenzienkit zur Isolierung von Nukleinsäuren
⑤⑦ Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe enthält
a) negativ geladene Partikel aus einem Polymermaterial,
b) ein Reagenz I, bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder/und ein Reagenz II, bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes, und
c) eine Proteinase-Lösung.
Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe versetzt man die Probe mit negativ geladenen Partikeln aus einem Polymermaterial und einem Reagenz, bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol oder bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes, trennt die Partikel in geeigneter Weise von der überstehenden Lösung ab, wäscht ggf. und löst die an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren mittels eines Elutionspuffers von den Partikeln.

DE 199 37 607 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Reagenzienkit für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe, ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe sowie ein Verfahren zur Amplifikation oder/und Bestimmung von Nukleinsäuren mittels PCR.

Bei der in US-PS 4.683 195 beschriebenen Polymerasekettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein einfaches Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Durch diese Vervielfältigung ist der Nachweis winzigster Mengen an Nukleinsäuren möglich geworden. Das Verfahren hat eine Nachweisesempfindlichkeit, die bisher in der wissenschaftlichen Analytik beispiellos ist: Wo früher ein Nachweis erst ab ca. 10^6 Molekülen möglich war, können jetzt schon etwa 10 bis 100 Moleküle nachgewiesen werden. Eine aktuelle und spektakuläre Anwendung dieser Nachweisesempfindlichkeit ist z. B. die Identifizierung von Tätern bei der Verbrechensaufklärung. Die PCR-Technologie ist ein zentraler Bestandteil der in der Öffentlichkeit diskutierten Erstellung einer "Gen-Kartei". Auch für den Nachweis von gentechnisch-veränderten Lebensmitteln oder die Untersuchung von Blutkonserven auf Viren wie HIV oder HCV ist die PCR unerlässlich.

In kürzester Zeit hat sich die PCR-Technologie im wissenschaftlichen Alltag etabliert und stellt damit einen Wachstumsmarkt dar. Voraussetzung für das PCR-Verfahren ist eine sogenannte "Probenvorbereitung", welche die Nukleinsäuren aus den verschiedensten Materialien wie Speichel, Blut, Liquor; Organismen wie z. B. Bakterien, Hefen, Pilzen aber auch Pflanzenmaterial, Fleisch und weiteren nukleinsäurehaltigen Proben freisetzt und so vorbereitet, dass das PCR-Verfahren ohne Störungen durchgeführt werden kann. Diese Probenvorbereitung ist derzeit das Nadelöhr für die breite Anwendung, weil vor allem automatisierbare Verfahren fehlen.

Für die Automatisierung sind Partikel als Festphase von großer Bedeutung, die entweder verbunden mit Filtration oder Zentrifugation in der Probenvorbereitung eingesetzt werden, oder aber in Form von sogenannten Magnetpartikeln mit Hilfe von magnetischen Feldern abgetrennt werden können. Als zusammenfassende Literaturstelle wird US 4,554,088 genannt.

In der Literatur sind verschiedene Verfahren für die Probenvorbereitung zur PCR beschrieben, so z. B. unter Verwendung von anorganischen Silikatoberflächen als Adsorber für Nukleinsäuren, die in Gegenwart von chaotropen Salzen nach EP 0 389 063 an das Silika binden und mit diesem Prinzip isoliert werden können.

Die US-PS 5,705,628 beschreibt als Adsorber für Nukleinsäuren Magnetpartikel, die Carboxylgruppen an der Oberfläche tragen. Die Verwendung solcher Partikel ist in einem Mehrschritprozess beschrieben, bei dem zunächst in einer zeitlich gestaffelten Abfolge zu einer Probe ein Lysepuffer zum Aufschluß der Probe, anschließend die Magnetpartikelsuspension und danach ein spezieller Puffer, der die Polarität und Hydrophobizität der resultierenden Lösung so einstellt, daß Nukleinsäuren an die Magnetpartikel reversibel binden, zugegeben wird. Es handelt sich dabei um einen hochviskosen Puffer, der Polyethylenglykol (20 %) zusammen mit 2,5 M Kochsalz enthält (im Folgenden PEG-Puffer genannt).

Nach ein- oder mehrmaligem Waschen der Magnetpartikel und Resuspension der Magnetpartikel in einem Elutionspuffer wird die Nukleinsäure desorbiert und kann nach Abtrennen der Magnetpartikel entnommen werden. Für eine Automatisierung ergeben sich aber aus diesem Prozeß drei Probleme:

- a) Die in einer zeitlich gestaffelten Abfolge notwendigen Pipettierschritte sind für eine Automatisierung, z. B. mit einem Pipettierroboter, äußerst zeitaufwendig, so daß dieses Verfahren nicht für einen höheren Probendurchsatz geeignet ist.
- b) Der Einsatz eines hochviskosen Puffers erfordert bei der Automatisierung einen erheblichen Aufwand, eine entsprechend notwendige Durchmischung zu erreichen. Da vor allem bei Automatisierungen 96-Well-Mikrotiterplatten als Reaktionsgefäße eingesetzt werden, muß durch eine entsprechende Schüttel- oder Rüttel-Apparatur oder andere mechanische Durchmischung dafür gesorgt werden, daß in allen Gefäßen eine gleichmäßige Mischung erfolgt.
- c) Eine weitere Problematik ergibt sich aus der Tatsache, daß die Proben vielfältiger Natur sind. Die bekannten Methoden der Probenvorbereitung ließen für viele Proben im Hinblick auf ihre Effektivität zu wünschen übrig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, eine Möglichkeit bereitzustellen, die Probenvorbereitung effektiver zu gestalten und dabei die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden. Insbesondere war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Möglichkeiten bereitzustellen, die Probenvorbereitung und gegebenenfalls auch die spätere PCR-Reaktion mit Hilfe des Einsatzes von Pipettierrobotern durchzuführen und hierfür eine Vereinfachung und Automatisierung der bisherigen Verfahren zu ermöglichen.

Diese Aufgabe wurde erfindungsgemäß gelöst durch einen Reagenzienkit für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe, welcher dadurch gekennzeichnet ist, daß er

- a) negativ geladene Partikel aus einem Polymermaterial,
- b) ein Reagenz I bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder/und ein Reagenz II, bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes, und
- c) eine Proteinase-Lösung

enthält.

Der Begriff "biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente" bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung alle Strukturen in zu untersuchenden Proben, aus denen Nukleinsäuren durch Lyse freigesetzt werden müssen. Insbesondere sind Zellen, einschließlich bakterieller oder Hefe-Zellen, sowie Viren von dieser Definition umfasst.

Der erfindungsgemäße Reagenzienkit beinhaltet als Reagenzien I oder/und II Zusammensetzungen mit überraschend einfachen Rezepturen, die für eine effektive Lyse der Proben, d. h. der biologischen, nukleinsäurehaltigen Kompartimente, eingesetzt werden können. Des weiteren ermöglichen die im erfindungsgemäßen Reagenzienkit enthaltenen Re-

genzien I und II eine sofort nach der Lyse stattfindende Bindung der freigesetzten Nukleinsäuren an die Polymerpartikel, ohne daß der Puffer gewechselt bzw. Zugabe anderer Substanzen nötig ist. Durch Einsatz von neutralen kationischen oder anionischen Detergenzien in hohen Konzentrationen zusammen mit aliphatischen Alkoholen kann eine besonders effiziente und vollständige Lyse erreicht werden, was insbesondere auf Proben zutrifft, welche Hefezellen enthalten. Bei Verwendung des Reagenz II enthaltend eine wäßrige Lösung mindestens eines chaotropen Salzes kann eine besonders effektive Lyse von Proben enthaltend Vollblut bewirkt werden. Für alle anderen Anwendungsfälle sind die Reagenzien I und II ebenfalls geeignet, wobei für den jeweiligen Anwendungsfall die bessere Eignung des einen oder anderen Reagenz vom Fachmann vorab leicht bestimmt werden kann.

Der erfindungsgemäße Reagenzienkit ermöglicht die Durchführung der Lyse von Zellen oder Viren und Bindung der Nukleinsäuren an Partikel sowie die Abtrennung der Partikel von der Probenlösung in einem quasi Einschnittverfahren, in dem zu einer Mischung aus Partikeln, Reagenz I oder II und Proteinase-Lösung die Probensubstanz zugegeben wird, und nach entsprechender Inkubation die Probenlösung wieder abgetrennt werden kann unter Zurücklassung der aus den Zellen abgetrennten Nukleinsäuren in an die Polymerpartikel gebundener Form.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung enthält der Reagenzienkit zusätzlich noch Waschpuffer oder/und Elutionspuffer zur Abtrennung der Nukleinsäuren von den Polymerpartikeln.

Der erfindungsgemäße Reagenziensatz beinhaltet damit in besonders bevorzugter Ausführungsform alle Reagenzien zur Durchführung einer Nukleinsäureisolierung aus Proben. Dabei besteht die Möglichkeit, die Reagenzien zunächst einzeln, also jeweils in separaten Flaschen, im Reagenziensatz vorzuhalten und erst unmittelbar vor der Anwendung eine stabile Arbeitslösung herzustellen. Dies hat den Vorteil, daß je nach Probe sehr unterschiedliche Lyseprinzipien angewandt werden können. So wurde überraschenderweise festgestellt, daß ein Puffer mit Natriumdodecylsulfat zusammen mit Ethanol für die Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe besonders vorteilhaft ist, während ein Puffer mit Guanidiniumthiocyanat für den Aufschluß und die Isolierung von Nukleinsäuren aus Vollblut besser geeignet ist.

Der erfindungsgemäße Reagenzienkit enthält daher in einer bevorzugten Ausführung in separaten Flaschen die Reagenzien A) Partikel, B) Reagenz I mit Detergenz/Alkohol-Gemisch, C) Reagenz II mit hochmolaren Salzen von chaotropen Verbindungen sowie D) eine Proteinase-Lösung.

Darüber hinaus kann der erfindungsgemäße Reagenzienkit auch eine oder mehrere Arbeitslösungen, enthaltend Mischungen aus A, B und D sowie aus A, C und D gebrauchsfertig vorhalten.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit, der sowohl Reagenz I als auch Reagenz II beinhaltet, ist geeignet für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer großen Vielzahl von Proben, wobei jeweils bezogen auf die Anwendung die letztendliche Herstellung der Arbeitslösung durch den Anwender erfolgt. Selbstverständlich ist auch ein Reagenzienkit im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt, welcher nur eines der beiden Reagenzien beinhaltet und daher besonders geeignet ist für z. B. die Isolierung von Nukleinsäuren aus Hefe-enthaltenden Proben bzw. Vollblut. Die Anwendung eines der Reagenzien bei anderen Proben soll durch diese bevorzugten Anwendungen nicht eingeschränkt sein.

Wie bereits erwähnt, können weitere Komponenten des erfindungsgemäßen Reagenzienkits Waschlösungen für die Partikel sein, die in einer separaten Flasche abgefüllt sind. Zur Elution der Nukleinsäure von den Partikeln wird ein Elutionspuffer benötigt, der sich insbesondere durch niedrige Ionenstärke auszeichnen sollte. Diese Komponente kann ebenfalls ein Teil des erfindungsgemäßen Reagenziensatzes sein. Sowohl geeignete Waschlösungen als auch Elutionspuffer sind im Prinzip dem Fachmann bekannt.

Die Funktionsweise der einzelnen Bestandteile des erfindungsgemäßen Reagenzienkits wird im Folgenden geschildert:

Eine Probe wird mit einer Arbeitslösung enthaltend die Bestandteile A, B, D oder A, C, D versetzt und inkubiert. Im Einzelfall kann die Inkubation bei höherer Temperatur stattfinden. Die Arbeitslösung bewirkt gleichzeitig den Aufschluß der Probe, die Freisetzung der Nukleinsäuren sowie die Bindung an die Partikel, die Bestandteil der Arbeitslösung sind. Die Partikel werden abgetrennt, der klare Überstand abgesaugt und verworfen. Die Partikel werden danach in einer geeigneten Waschlösung gewaschen, wobei sich alkoholische Lösungen wiederum aus Gründen der einfachen Mischbarkeit als besonders vorteilhaft erwiesen. Insbesondere Wasser/Ethanol- oder allgemein Wasser/aliphatischer Alkohol-Gemische im Verhältnis 70 bis 30 Teile Wasser mit 30 bis 70 Teilen Alkohol ergeben im Rahmen der Erfindung befriedigende Ergebnisse. Der Waschprozeß wird je nach Probe ein- oder mehrmals wiederholt und die gewaschenen und abgeschiedenen Partikel mit einem Puffer niedriger Ionenstärke aufgenommen, so daß die Nukleinsäuren desorbieren und in Lösung gehen. Danach kann eine Weiterverarbeitung z. B. für eine PCR-Amplifikation erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält der Reagenzienkit als negativ geladene Partikel solche aus Polystyrol oder Polyvinylalkohol, wobei die Partikel aus Polyvinylalkohol eine besonders bevorzugte Ausführungsform darstellen.

Obwohl es prinzipiell natürlich möglich ist, nicht magnetisch beeinflussbare Partikel zu verwenden, ist es bevorzugt, magnetisch beeinflussbare Partikel vorzusehen, welche bei der Isolierung der Nukleinsäuren besonders leicht über einen Magneten an einer Stelle im Reaktionsgefäß konzentriert werden können und von denen die verbleibende Probenlösung besonders einfach abgetrennt werden kann.

Bevorzugt weisen die Partikel im Reagenzienkit einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,1 bis 100 µm und insbesondere von 1 bis 10 µm auf. Partikel dieser Durchmesser erlauben eine gute und effektive Bindung von Nukleinsäuren.

Die negative Ladung der Partikel beruht in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung auf der Anwesenheit von Carboxylgruppen auf der Oberfläche der Partikel. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt einzusetzende Partikel sind z. B. in der EP 0 843 591 beschrieben.

Bevorzugt enthält das Reagenz I des erfindungsgemäßen Reagenzienkits als Detergens Natriumdodecylsulfat oder Cetylammmoniumbromid (CTAB), vorzugsweise jeweils in einer Menge von 1 bis 10% bezogen auf das Reagenzvolumen.

Als aliphatischer Alkohol ist in Reagenz I vorzugsweise Ethanol enthalten, wobei eine Konzentration von mindestens 40 Vol. % zu guten Ergebnissen führt und daher bevorzugt ist.

Reagenz II enthält bevorzugt wässrige Lösungen von Guanidiniumhydrochlorid oder -thiocyanat, wobei wiederum Konzentrationen dieser Salze von 2 bis 8 M bevorzugt sind.

Die Reagenzien I und II enthalten ggf. weitere übliche und geeignete Puffer- und/oder Hilfssubstanzen. Beispielhaft für Puffersubstanzen sei TRIS/HCL genannt, Hilfssubstanzen können z. B. Komplexbildner wie EDTA sein. Der pH-Wert der Reagenzien wird vorzugsweise auf ungefähr den physiologischen pH eingestellt.

Die im erfindungsgemäßen Reagenzienkit enthaltene Proteinase dient zur Vermeidung von Störungen aufgrund der Anwesenheit von Proteinen nach Aufschluss der biologischen, nukleinsäurehaltigen Kompartimente. Bevorzugt wird hierzu im erfindungsgemäßen Reagenzienkit Proteinase K eingesetzt, wobei die Menge an eingesetzter Proteinase bei der Nukleinsäure-Isolierung von der Menge der vorhandenen Zellen und damit von der Menge der Proteine abhängig ist. Geeignete Konzentrationen von Proteinase kann der Fachmann leicht ermitteln.

Der erfindungsgemäße Reagenzienkit ermöglicht eine leichte und schnelle Isolierung von Nukleinsäuren aus Proben, insbesondere für die anschließende Durchführung einer PCR-Reaktion. Da lediglich Probe zu z. B. einer vorbereiteten Arbeitslösung enthaltend alle anderen notwendigen Komponenten zugegeben werden muß, nach Separierung der Partikel über einen z. B. einen Magneten leicht die verbleibende Probenlösung entfernt werden kann und nach ggf. nötigen Waschen eluiert werden kann unter Gewinnung der Nukleinsäuren, kann ein entsprechendes Verfahren leicht automatisiert werden. Lediglich ca. 4 Pipettierschritte sind nötig bis zur letztendlichen Probengewinnung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Probe mit negativ geladenen Partikeln aus einem Polymermaterial und einem Reagenz, bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes versetzt, die Partikel in geeigneter Weise von der überstehenden Lösung abtrennt, ggf. wäscht und die an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren mittels eines Elutionspuffers von den Partikeln löst.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im Prinzip unter Verwendung der oben bereits für den erfindungsgemäßen Reagenzienkit beschriebenen Komponenten durchgeführt, weshalb für eine nähere Beschreibung der Komponenten auf die obigen Ausführungen verwiesen wird. Es ist dabei bevorzugt, eine Proteinase, vorzugsweise Proteinase K zur Vermeidung von Störungen durch Proteine zuzusetzen. Die verwendeten Partikel und Reagenzien entsprechen den oben beschriebenen, ebenso wie geeignete Wasch- und Elutionspuffer, die ebenfalls im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Besonders bevorzugt wird zum Waschen mindestens 60 %iges Ethanol eingesetzt. Es ist außerdem bevorzugt, zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Proben enthaltend Hefen, ein Reagenz enthaltend Detergens und Alkohol entsprechend Reagenz I zu verwenden, wogegen zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Vollblut insbesondere ein Reagenz enthaltend chaotrope Salze entsprechend Reagenz II eingesetzt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann prinzipiell zur Isolierung von DNA oder RNA angewandt werden, wobei allerdings die Isolierung von DNA bevorzugt ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Amplifikation oder/und Bestimmung von Nukleinsäuren mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion, bei dem die zu amplifizierende Nukleinsäure aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe mit Hilfe des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. mit Hilfe des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Reagenzienkits isoliert wird. Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist nämlich auch darin zu sehen, daß die Nukleinsäuren nach der Abtrennung von den Polymerpartikeln im Elutionspuffer unmittelbar zu einer PCR Reaktion eingesetzt werden können. Die PCR-Reaktion an sich oder/und die Identifizierung der Nukleinsäuren z. B. durch Sequenzierung können nach bekannten Methoden durchgeführt werden.

Durch die erfindungsgemäßen Verfahren sowie den erfindungsgemäßen Reagenzienkit werden einfach und leicht automatisierbare Möglichkeiten zur Probenvorbereitung für die PCR bereitgestellt, die eine erhebliche weitere Vereinfachung bei der Analyse von Nukleinsäurehaltigen Proben darstellen.

Die folgenden Beispiele sollen in Verbindung mit den Figuren die Erfindung weitere erläutern.

Beispiele

1. Bindung von λ -HindIII-Marker-DNA an Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung

0,5 μ g λ -HindIII-Marker-DNA in 10 μ l bidest. Wasser wurden in einer Thermosprint-Platte [Fa. Innova, Mannheim] mit einer Arbeitslösung hergestellt aus 250 μ g Partikeln aus Polyvinylalkohol (hergestellt nach EP 0 843 591) in 5 μ l bidest. Wasser, 5 μ l Proteinase K-Lösung [1 373 196, Fa. Roche, Mannheim] und 130 μ l BILATEST-Lysepuffer 1 (SDS) bestehend aus 5% Natriumdodecylsulfat [L4390, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584, Fa. Sigma, München], 10 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], 0% bis 80% Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] versetzt.

Anschließend werden die Partikel mit einem Magneten abgetrennt, der Überstand abgenommen und die Partikel mit 150 μ l 80% Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] in bidest. Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt; danach werden die Partikel in 150 μ l BILATEST-Elutionspuffer bestehend aus 10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.] und 1 mM EDTA [s.o.] resuspendiert, bei 65°C für 5 min inkubiert und mit einem Magneten wie zuvor abgetrennt. Die gereinigte Nukleinsäure wird im Überstand abgenommen. Die Analyse in einem Standard-Agaroseflächengel (0,8% Agarose [A9311, Fa. Sigma, München]) ergibt ein Bild wie Fig. 1.

Fig. 1

Spur	Inhalt
1, 2	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 0% Ethanol
3, 4	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 10% Ethanol

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

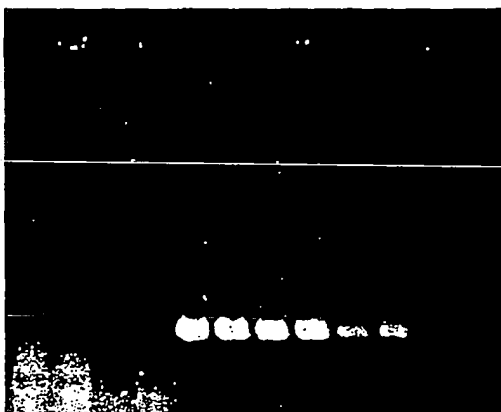


Fig. 12

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



Fig. 13

M 1 2



Fig. 10

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



Fig. 11

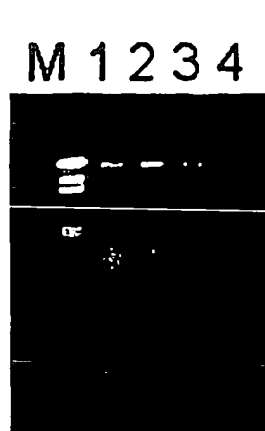


Fig. 7

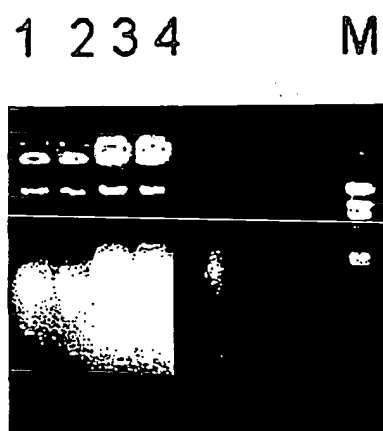


Fig. 8

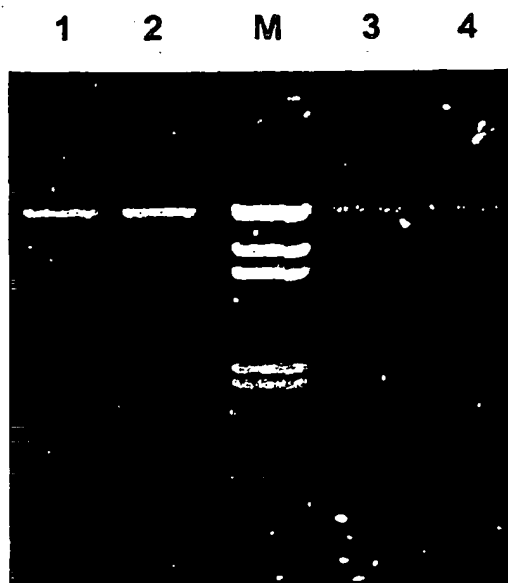


Fig. 9

M 1 2 3 4

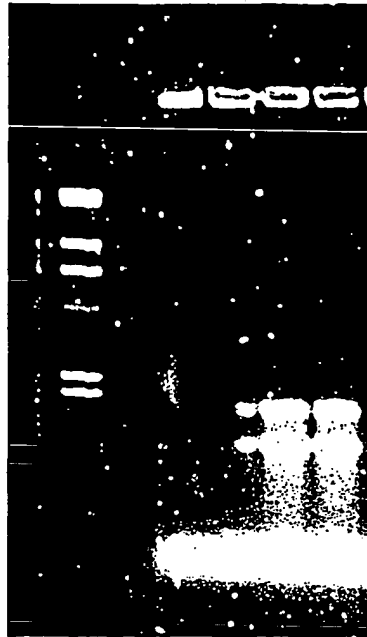


Fig. 5

M 1 2 3 4 5 6 7 8

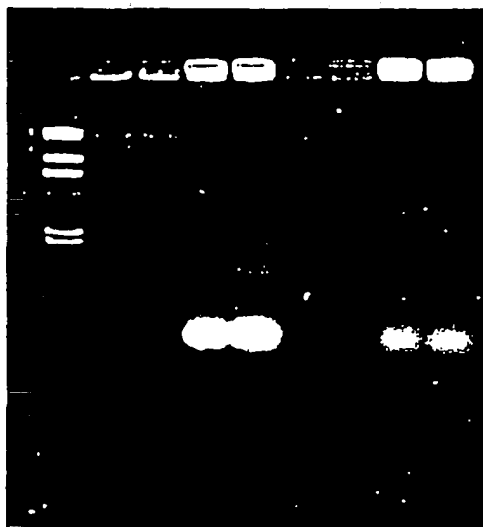


Fig. 6



Fig. 1

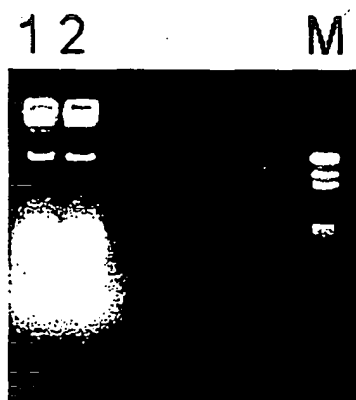


Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4

- Leerseite -

Partikel in geeigneter Weise von der überstehenden Lösung abtrennt, ggf. wäscht und die an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren mittels eines Elutionspuffers von den Partikeln löst.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzlich zu dem Reagenz eine Proteinase, vorzugsweise Proteinase-K, zusetzt.

5 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man als Partikel aus Polymermaterial Polystyrol oder insbesondere Polyvinylalkoholpartikel einsetzt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man magnetisch beeinflussbare Partikel verwendet und diese mit Hilfe eines Magneten von der überstehenden Lösung separiert.

10 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man Partikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,1 bis 100 µm und insbesondere von 1 bis 10 µm verwendet.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man Partikel mit Carboxylgruppen an der Oberfläche verwendet.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Proben enthaltend Hefezellen ein Reagenz enthaltend Natriumdodecylsulfat oder DTAB, vorzugsweise in Mengen von 1 bis 10% verwendet.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz als aliphatischen Alkohol Ethanol, vorzugsweise in einer Konzentration von mindestens 40 Vol.% verwendet.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Isolierung von Nukleinsäuren insbesondere aus Vollblut ein Reagenz enthaltend Guanidiniumhydrochlorid oder Guanidiniumthiocyanat, vorzugsweise jeweils in Konzentrationen von 2 bis 8 M, verwendet.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man den Reagenzien weitere Puffersubstanzen und/oder Komplexbildner zusetzt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß man die separierten mit Nukleinsäuren beladenen Partikel mit einem Waschpuffer enthaltend mindestens 60% Ethanol wäscht.

25 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man es unter Verwendung eines Reagenzienkits nach einem der Ansprüche 1 bis 12 durchführt.

25. Verfahren zur Amplifikation oder/und Bestimmung von Nukleinsäuren mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), dadurch gekennzeichnet, daß man die zu amplifizierenden Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe mit Hilfe eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 13 bis 24 gewinnt und die Amplifikationsreaktion sowie ggf. die Bestimmung nach an sich bekannten Methoden bewirkt.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

b) Humanblut

Mit der isolierten Human-DNA aus Beispiel 9 wird eine PCR (US 4 683 195) mit den Primern

β -Af: 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3'

β -Ar: 5'-CTA GAA GCA TTT GCC GTG GAC GAT GGA GGG-3'

[Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg bei München] durchgeführt. Mit diesen Primern wird ein 600 bp-Fragment aus dem β -Actin-Gen des Menschen amplifiziert.

Die PCR-Ansätze werden wie unter a) beschrieben vorgenommen. Nach der PCR werden die Proben mit 15–20% Gel-Ladepuffer mit EDTA [Fa. Sigma, München] versetzt. Die Amplifikate wurde auf einem Standardagarosegel (1,6%) analysiert (in Fig. 13 dargestellt).

Fig. 13

Spur	Inhalt	
1	30 μ L DNA-Lösung	15
2	Wiederholung von Spur 1	
3	10 μ L DNA-Lösung	
4	Wiederholung von Spur 3	
5	1 μ L DNA-Lösung	
6	Wiederholung von Spur 5	20
7	0,1 μ L DNA-Lösung	
8	Wiederholung von Spur 7	
9	0,01 μ L DNA-Lösung	
10	Wiederholung von Spur 9	
11	0,001 μ L DNA-Lösung	25
12	Wiederholung von Spur 11	
M	Marker 100 bp-Leiter	

Patentansprüche

1. Reagenzienkit für die Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe, dadurch gekennzeichnet, dass er
 - a) negativ geladene Partikel aus einem Polymaterial,
 - b) ein Reagenz I bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder/und ein Reagenz II, bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes, und
 - c) eine Proteinase-Lösung
 enthält.
2. Reagenzienkit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er negativ geladene Partikel aus Polystyrol oder insbesondere aus Polyvinylalkohol enthält.
3. Reagenzienkit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel magnetisch beeinflussbar sind.
4. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,1 bis 100 μ m und insbesondere von 1 bis 10 μ m aufweisen.
5. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel Carboxylgruppen an der Oberfläche aufweisen.
6. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz I als Detergens Natriumdodecylsulfat oder DTAB, vorzugsweise in einer Menge von 1 bis 10% enthält.
7. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz I als aliphatischen Alkohol Ethanol, vorzugsweise in einer Konzentration von mindestens 40 Vol. % enthält.
8. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Reagenz II als chaotrope Salze Guanidiniumhydrochlorid oder Guanidiniumthiocyanat, vorzugsweise in Konzentrationen von 2 bis 8 M enthält.
9. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Proteinase K-Lösung enthält.
10. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien I oder/und II weitere Puffer- oder/und Komplexbildungssubstanzen enthalten.
11. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien I und II einen pH-Wert von 6 bis 8 aufweisen.
12. Reagenzienkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich
 - d) Waschpuffer oder/und
 - e) Elutionspuffer zur Ablösung der an die Partikel gebundenen Nukleinsäuren
 enthält.
13. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologische, nukleinsäurehaltige Kompartimente enthaltenden Probe, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probe mit negativ geladenen Partikeln aus einem Polymaterial und einem Reagenz, bestehend aus einem Gemisch eines geladenen oder ungeladenen Detergens und einem aliphatischen Alkohol, oder bestehend aus einer wässrigen Lösung mindestens eines chaotropen Salzes versetzt, die

Fig. 11

Spur	Inhalt
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,644,412,312,010,56 KB
5 1, 2	Eluat aus Beispiel 10, Lyse 1 min
3, 4	Eluat aus Beispiel 10, Lyse 5 min
5, 6	Eluat aus Beispiel 10, Lyse 10 min
7, 8	Eluat aus Beispiel 10, Lyse 15 min

10

Der Aufschluss verläuft sehr schnell, bereits nach 1 min erhält man eine hohe DNA-Ausbeute. Dies entspricht auch den Beobachtungen bei unseren Versuchen mit den Hefen, die ebenfalls schon nach 1 min aufgeschlossen werden konnten.

15

12. Isolierung von Nucleinsäuren aus Hefe mittels Agarose-Partikeln beschichtet mit Glutaminsäure

Der Versuch aus Beispiel 4 wurde mit Agarosepartikeln, beschichtet mit Glutaminsäure (G2759, Fa. Sigma, München) wiederholt. Das Ergebnis war ähnlich dem in Fig. 4 gezeigten Ergebnis von Beispiel 4, allerdings war die Ausbeute wesentlich geringer.

20

13. PCR-Experimente

a) Hefe

25 Mit der isolierten Hefe-DNA aus Beispiel 3 wird eine PCR (US 4 683 195) mit den Primern

KV80: 5'-GCG GAT CCT TAA GTC CAA TCG TCA AAA TT-3'

KV102: 5'-GCG AAT TCG TAT CTT CTT TGC CCA AGG AA-3'

[Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg bei München] durchgeführt. Mit diesen Primern wird ein 496 bp-Fragment aus dem BCY1-Gen der Hefe amplifiziert. Die PCR-Ansätze enthalten die folgenden Bestandteile:

30 0,5 μ L Primer-Lösung 1 (50 μ mol μ L⁻¹ in H₂O bidest)

0,5 μ L Primer-Lösung 2 (50 μ mol μ L⁻¹ in H₂O bidest)

2 μ L dNTP-Lösung, Konzentration der Nukleotide je 5 mM (Eurogentec, Seraing, Belgien)

4 μ L MgCl₂-Lösung 25 mM (Eurogentec)

5 μ L 10 \times PCR-Puffer (Eurogentec)

35 0,5 μ Taq-Polymerase (Eurogentec)

bis zu 30 μ L DNA- oder Probenlösung

in einem Gesamtvolumen von 50 μ L. Während des Ansatzes wird die PCR-Platte auf 4°C gekühlt. Nach Zugabe der letzten Lösung werden die Proben einmal mit einer Pipette gemischt. Die PCR wird in Thermosprint-Platten [Fa. Innova GmbH, Mannheim] im Primus 96 Plus [MWG Biotech AG, München] durchgeführt. Das Programm umfasst die folgenden Schritte:

40

Deckelheizung auf 110°C

3 min 94°C

27 Zyklen mit

-30 s 94°C

45

-30 s 50°C

-2 min 72°C

5 min 72°C

Kühlung auf 4°C

50

Nach der PCR werden die Proben mit 15-20% Gel-Ladepuffer mit EDTA [Sigma, München] versetzt. Die Amplifikation wurde auf einem Standardagarosegel (1,6%) analysiert (in Fig. 12 dargestellt).

Fig. 12

Spur	Inhalt
55 1	30 μ L DNA-Lösung
2	Wiederholung von Spur 1
3	10 μ L DNA-Lösung
4	Wiederholung von Spur 3
5	1 μ L DNA-Lösung
60 6	Wiederholung von Spur 5
7	0,1 μ L DNA-Lösung
8	Wiederholung von Spur 7
9	0,01 μ L DNA-Lösung
10	Wiederholung von Spur 9
65 11	0,001 μ L DNA-Lösung
12	Wiederholung von Spur 11

Spur	Inhalt
3	Eluat aus Beispiel 7 1 : 10 verdünnt
4	Wiederholung Spur 3

8. Isolierung von Nukleinsäuren aus einem Gemisch von EDTA-Kaninchenvollblut und Hefezellen mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber 5

10⁸ Hefezellen in 10 µl EDTA-Kaninchenblut wurden sowohl wie Beispiel 3 als auch wie Beispiel 7 behandelt. Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8% Agarose [s.o]) ergibt ein Bild wie Fig. 8. 10

Fig. 8

Spur	Inhalt
1	Eluat aus Beispiel 8 mit Lysepuffer aus Beispiel 2
2	Wiederholung Spur 1
3	Eluat aus Beispiel 8 mit Lysepuffer aus Beispiel 7
4	Wiederholung Spur 3
M	Marker (λ-HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB

Aus dieser Darstellung ergibt sich der Hinweis, dass sich die Hefezellen mit dem SDS-Lysepuffer aus Beispiel 1 und 2 selektiv lysieren lassen, während Vollblut sich selektiv mit dem Guanidin-Puffer aus Beispiel 4 lysieren lässt. 20

9. Isolierung von Nukleinsäuren aus humanem EDTA-Vollblut mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und Guanidiniumthiocyanat-Lösung 25

Beispiel 7 wurde mit humanem Vollblut wiederholt. Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8% Agarose [Fa. Sigma, München]) ergibt ein Bild wie Fig. 9. 30

Fig. 9

Spur	Inhalt
1	Eluat aus Beispiel 9 mit Lysepuffer aus Beispiel 7
2	Wiederholung Spur 1
M	Marker (λ-HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB
3	Eluat aus Beispiel 9 mit Lysepuffer aus Beispiel 2
4	Wiederholung Spur 3

10. Isolierung von Nukleinsäuren aus der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber 40

Der Versuch aus Beispiel 4 wurde mit 10⁸ Zellen der humanpathogenen Hefe *Candida albicans* wiederholt. Diese Hefe zeichnet sich durch eine besonders starke und schwer zu lysierende Zellwand aus. 45

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.] analysiert und in Fig. 10 dargestellt. 45

Fig. 10

Spur	Inhalt
M	Marker (λ-HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB
1	Eluat aus Beispiel 10
2	Wiederholung Spur 1

11. Isolierung von Nukleinsäuren aus dem gram-positiven Bakterium *Lactococcus lactis* mittels Magnetpartikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber 50

Der Versuch aus Beispiel 4 wurde mit dem gram-positiven Bakterium *Lactococcus lactis* wiederholt. Gram-positive Bakterien besitzen ebenfalls eine besonders starke und schwer zu lysierende Zellwand. Es wurden Lysezeiten von 1 min bis 15 min verwendet. 60

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.] analysiert und in Fig. 11 dargestellt. 65

Spur	Inhalt
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB

5. Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung

Beispiel 3 und 4 wurden im direkten Vergleich wiederholt.

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.]) analysiert und in Fig. 5 dargestellt.

Fig. 5

Spur	Inhalt
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB
1, 2	Eluat aus Beispiel 5, Elution bei RT
3, 4	Eluat aus Beispiel 5, Elution bei 65°C

Die Elution bei RT führt zu einer geringeren Elution von kleineren Nukleinsäure-Molekülen, z. B. RNA (die unteren beiden Banden in Spur 3 und 4). Diese Selektivität kann zur Trennung von verschiedenen Nukleinsäuremolekülen ausgenutzt werden.

6. Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung

Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei Lysepuffer mit SDS oder mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid, 9161.1, Fa. Roth, Karlsruhe) verglichen wurden, jeweils mit 50% Ethanol oder ohne Ethanol.

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.]) analysiert und in Fig. 6 dargestellt.

Fig. 6

Spur	Inhalt
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB
1, 2	Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5% SDS
3, 4	Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5% SDS und 50% Ethanol
5, 6	Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5% CTAB
7, 8	Eluat aus Beispiel 6, Lysepuffer mit 5% CTAB und 50% Ethanol

CTAB kann statt SDS eingesetzt werden, ohne Ethanol findet jedoch in beiden Fällen keine Bindung der genomischen DNA statt. In Kontrollversuchen wurde gezeigt, dass der Zellaufschluss auch ohne Ethanol erreicht wird, die geringe Ausbeute bei den Proben ohne Ethanol ist daher auf die geringe Bindung der DNA in Abwesenheit von Ethanol zurückzuführen.

7. Isolierung von Nukleinsäuren aus EDTA-Kaninchenvollblut mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und Guanidiniumthiocyanat-Lösung

Zunächst wird für einen Testansatz eine Arbeitslösung hergestellt aus 250 μ g Partikeln aus Polyvinylalkohol (hergestellt nach EP 0 843 591) in 5 μ l bidest. Wasser, 5 μ l Proteinase K-Lösung (1 373 196, Fa. Roche, Mannheim) und 130 μ l BILATEST-Lysepuffer II (Gu-SCN) bestehend aus 6 M Guanidiniumthiocyanat [G9277, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584, Fa. Sigma, München], 1 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], 2,5% Natriumlaurylsulfat (L9150 Fa. Sigma, München), pH 7,0.

10 μ l EDTA-Kaninchenvollblut werden mit 140 μ l der zuvor beschriebenen Arbeitslösung versetzt und 15 min bei 37°C verschlossen inkubiert. Anschliessend werden die Partikel mit einem Dauermagnet auf den Boden gezogen und der Überstand abgenommen. Die Partikel werden mit 150 μ l 80% Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] in bidest. Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt; danach werden die Partikel in 150 μ l BILATEST-Elutionspuffer bestehend aus 10 mM Tris/HCl pH 7,0 [s.o.] und 1 mM EDTA [s.o.] resuspendiert, bei 65°C für 10 min inkubiert, wie zuvor abgetrennt und die gereinigte Nukleinsäure im Überstand abgenommen. Die Analyse in einem Standardagaroseflachbettgel (0,8% Agarose [Fa. Sigma, München]) ergibt ein Bild wie Fig. 7.

Fig. 7

Spur	Inhalt
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB
1	Eluat aus Beispiel 7 unverdünnt
2	Wiederholung Spur 1

Spur	Inhalt
5, 6	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 20% Ethanol
7, 8	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 30% Ethanol
9, 10	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 40% Ethanol
11, 12	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 50% Ethanol
13, 14	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 60% Ethanol
15, 16	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 70% Ethanol
17, 18	Eluat aus Beispiel 1, Lysepuffer mit 80% Ethanol
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB

Die Bindung der DNA an die Magnetpartikel ist deutlich abhängig von der Ethanol-Konzentration, unter 50% Ethanolkonzentration ist kaum Bindung zu beobachten.

2. Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mit Partikeln, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und Zentrifugation

Zunächst wird für einen Testansatz eine Arbeitslösung hergestellt aus 250 μ g Partikeln aus Polyvinylalkohol (hergestellt nach EP 0 843 591) in 5 μ l bidest. Wasser, 5 μ l Proteinase K-Lösung [1 373 196, Fa. Roche, Mannheim] und 130 μ l BILATEST-Lysepuffer I (SDS) bestehend aus 5% Natriumdodecylsulfat [L4390, Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584, Fa. Sigma, München], 10 mM EDTA [E5134, Fa. Sigma, München], 50% Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe].

Für einen Testansatz werden 10⁸ Hefe-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) in 10 μ l Volumen in einer Thermosprint-Platte [Fa. Innova, Mannheim] mit 140 μ l dieser Arbeitslösung versetzt und 15 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Partikel in einer Zentrifuge [Nr. 5810R; Fa. Eppendorf, Hamburg] für 2 min. 1000 rpm in einem Mikrotitrationsplattenrotor [Nr. A-4-62; Fa. Eppendorf, Hamburg] zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Partikel mit 150 μ l 80% Ethanol [5054.1, Fa. Roth, Karlsruhe] in bidest. Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt; danach werden die Partikel in 150 μ l BILATEST-Elutionspuffer bestehend aus 10 mM Tris/HCl pH 7.0 [s.o.] und 1 mM EDTA [s.o.] resuspendiert, bei 65°C für 10 min inkubiert und durch Zentrifugation wie zuvor abgetrennt. Die gereinigte Nukleinsäure wird im Überstand abgenommen. Die Analyse in einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8% Agarose [A9311, Fa. Sigma, München]) ergibt ein Bild wie Fig. 2.

Fig. 2

Spur	Inhalt
1	Eluat aus Beispiel 2
2	Wiederholung Spur 1
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB

3. Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung

Beispiel 2 wurde wiederholt, statt der Zentrifugation wurden die Partikel jedoch mit einem Dauermagnet [Fa. Rheinmagnet, Neunkirchen] abgetrennt.

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.]) analysiert und in Fig. 3 dargestellt.

Fig. 3

Spur	Inhalt
M	Marker (λ -HindIII): 23,119,416,614,412,312,010,56 KB
1	Eluat aus Beispiel 3
2	Wiederholung Spur 1

4. Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikel, beschichtet mit Carboxylgruppen, als Adsorber und magnetischer Abscheidung

Beispiel 3 wurde wiederholt, wobei die Elution nicht bei 65°C, sondern bei Raumtemperatur durchgeführt wurde.

Als Ergebnis wurde das Eluat mit einem Standard-Agaroseflachbettgel (0,8 % Agarose [s.o.]) analysiert und in Fig. 4 dargestellt.

Fig. 4

Spur	Inhalt
1	Eluat aus Beispiel 4
2	Wiederholung Spur 1